

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. Juli 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/052272 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/68,
A61K 47/48, G01N 33/50

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/15265

(22) Internationales Anmeldedatum:
21. Dezember 2001 (21.12.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 64 972.6 23. Dezember 2000 (23.12.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): EVOTEC OAI AG [DE/DE]; Schnackenburg-
allee 114, 22525 Hamburg (DE). MAX-PLANCK-
GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WIS-
SENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstrasse 8,
80539 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ROCKS, Oliver
[DE/DE]; c/o Max-Planck-Institut für molekulare Physi-
ologie, Otto-Hahn-Str. 11, 44139 Dortmund (DE). WIT-
TINGHOFFER, Alfred [DE/DE]; c/o Max-Planck-Institut
für molekulare Physiologie, Otto-Hahn-Str. 11, 44139
Dortmund (DE).

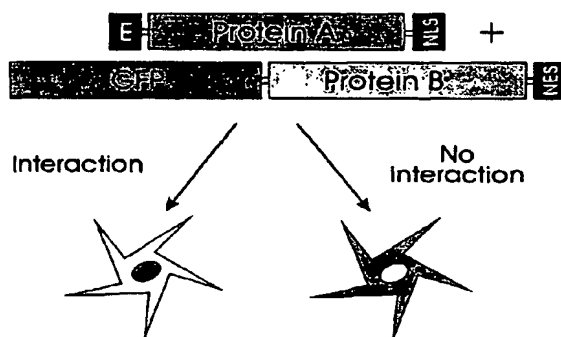
(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22
41, 50462 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: TECHNIQUE AND SCREENING METHOD FOR DETECTING REVERSIBLE PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS

(54) Bezeichnung: SCREENING-VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON REVERSIBLEN PROTEIN-PROTEIN WECHSELWIRKUNGEN



E: Epitope Tag
NLS: Nuclear Localisation Signal
NES: Nuclear Export Signal

(57) Abstract: The invention relates to methods and assays for detecting protein-protein interactions and for testing active substances in expression systems such as cells. According to the invention, protein I interacts with protein II, and a transfer of protein I into a cell compartment ensues, in which both protein I as well as protein II do not normally occur. When detecting protein II in the compartment, into which protein I was transferred, an interaction between protein I and protein II is determined.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung sind Verfahren und Assays zum Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen und zum testen von Wirkstoffen in Expressionssystemen wie Zellen, wobei ein Protein I mit einem Protein II interagiert, wobei ein Transfer des Protein I in ein Zellkompartiment erfolgt, in dem sowohl Protein I als auch Protein II natürlicherweise nicht vorkommen, und bei Nachweis von Protein II in dem Kompartiment, in das Protein I transferiert wurde, eine Wechselwirkung zwischen Protein I und Protein II festgestellt wird.

BEST AVAILABLE COPY

WO 02/052272 A3



(84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:**

10. Juli 2003

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/15265

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/68 A61K47/48 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, PAJ, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SCHNEIDER STEFAN ET AL: "Mutagenesis and selection of PDZ domains that bind new protein targets." NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 17, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 170-175, XP002175455 ISSN: 1087-0156 cited in the application abstract figure 4 page 174, left-hand column, line 1 - line 34	1-4,6
X	WO 00 05410 A (TECHNION RES & DEV FOUNDATION ; ARONHEIM AMI (IL)) 3 February 2000 (2000-02-03) claim 1	1,2

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 January 2003

Date of mailing of the international search report

22/01/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tuynman, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int Application No

PCT/EP 01/15265

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>RHEE YOON ET AL: "A genetic system for detection of protein nuclear import and export" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 18, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 433-437, XP002168963 ISSN: 1087-0156 abstract</p>	1-3,5
A	<p>PERANDER MARIA ET AL: "Nuclear import and export signals enable rapid nucleocytoplasmic shuttling of the atypical protein kinase C lambda." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, no. 16, 13 December 2000 (2000-12-13), pages 13015-13024, XP002175456 ISSN: 0021-9258 abstract figures 2,3,5,6 page 13023, line 22 - line 36</p>	1-7
A	<p>ZHANG MING JIE ET AL: "Tolerance of diverse amino acid substitutions at conserved positions in the nuclear export signal (NES) of HIV-1 Rev." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 243, no. 1, 4 February 1998 (1998-02-04), pages 113-116, XP002175457 ISSN: 0006-291X cited in the application the whole document</p>	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/15265

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0005410	A	03-02-2000	
		AU 4927499 A	14-02-2000
		EP 1098967 A2	16-05-2001
		WO 0005410 A2	03-02-2000
		US 2002137017 A1	26-09-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/15265

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 G01N33/68 A61K47/48 G01N33/50

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 G01N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, PAJ, WPI Data, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SCHNEIDER STEFAN ET AL: "Mutagenesis and selection of PDZ domains that bind new protein targets." NATURE BIOTECHNOLOGY, Bd. 17, Nr. 2, Februar 1999 (1999-02), Seiten 170-175, XP002175455 ISSN: 1087-0156 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Abbildung 4 Seite 174, linke Spalte, Zeile 1 - Zeile 34	1-4,6
X	WO 00 05410 A (TECHNION RES & DEV FOUNDATION ; ARONHEIM AMI (IL)) 3. Februar 2000 (2000-02-03) Anspruch 1	1,2

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. Januar 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

22/01/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Tuynman, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/15265

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>RHEE YOON ET AL: "A genetic system for detection of protein nuclear import and export"</p> <p>NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US,</p> <p>Bd. 18, Nr. 4, April 2000 (2000-04), Seiten 433-437, XP002168963 ISSN: 1087-0156 Zusammenfassung</p> <p>---</p>	1-3,5
A	<p>PERANDER MARIA ET AL: "Nuclear import and export signals enable rapid nucleocytoplasmic shuttling of the atypical protein kinase C lambda."</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 276, Nr. 16, 13. Dezember 2000 (2000-12-13), Seiten 13015-13024, XP002175456 ISSN: 0021-9258 Zusammenfassung Abbildungen 2,3,5,6 Seite 13023, Zeile 22 - Zeile 36</p> <p>---</p>	1-7
A	<p>ZHANG MING JIE ET AL: "Tolerance of diverse amino acid substitutions at conserved positions in the nuclear export signal (NES) of HIV-1 Rev."</p> <p>BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 243, Nr. 1, 4. Februar 1998 (1998-02-04), Seiten 113-116, XP002175457 ISSN: 0006-291X in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-7

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/15265

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0005410 A	03-02-2000	AU 4927499 A	14-02-2000
		EP 1098967 A2	16-05-2001
		WO 0005410 A2	03-02-2000
		US 2002137017 A1	26-09-2002

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. Juli 2002 (04.07.2002)

PCT

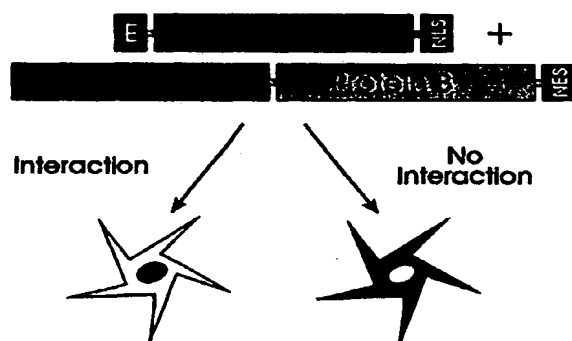
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/052272 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/68**
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP01/15265**
- (22) Internationales Anmeldedatum:
21. Dezember 2001 (21.12.2001)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:
100 64 972.6 23. Dezember 2000 (23.12.2000) **DE**
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **EVOTEC OAI AG** [DE/DE]; Schnackenburgallee 114, 22525 Hamburg (DE). **MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. BERLIN** [DE/DE]; Hofgartenstrasse 2, 80539 München (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ROCKS, Oliver** [DE/DE]; c/o Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Otto-Hahn-Str. 11, 44139 Dortmund (DE). **WITTINGHOFFER, Alfred** [DE/DE]; c/o Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Otto-Hahn-Str. 11, 44139 Dortmund (DE).
- (74) Anwälte: **MEYERS, Hans-Wilhelm** usw.; Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: **TECHNIQUE AND SCREENING METHOD FOR DETECTING REVERSIBLE PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS**

(54) Bezeichnung: **METHODE UND SCREENING-VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON REVERSIBLEN PROTEIN-PROTEIN WECHSELWIRKUNGEN**



E: Epitope Tag
NLS: Nuclear Localisation Signal
NES: Nuclear Export Signal

(57) Abstract: The invention relates to methods and assays for detecting protein-protein interactions and for testing active substances in expression systems such as cells. According to the invention, protein I interacts with protein II, and a transfer of protein I into a cell compartment ensues, in which both protein I as well as protein II do not normally occur. When detecting protein II in the compartment, into which protein I was transferred, an interaction between protein I and protein II is determined.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung sind Verfahren und Assays zum Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen und zum testen von Wirkstoffen in Expressionssystemen wie Zellen, wobei ein Protein I mit einem Protein II interagiert, wobei ein Transfer des Protein I in ein Zellkompartiment erfolgt, in dem sowohl Protein I als auch Protein II natürlicherweise nicht vorkommen, und bei Nachweis von Protein II in dem Kompartiment, in das Protein I transferiert wurde, eine Wechselwirkung zwischen Protein I und Protein II festgestellt wird.

WO 02/052272 A2



eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

- *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*
- *insgesamt in elektronischer Form (mit Ausnahme des Kopfbogens); auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich*

Methode und Screening-Verfahren zum Nachweis von reversiblen Protein-Protein Wechselwirkungen

Die vorliegende Erfindung liegt auf dem Gebiet der Zellbiologie und beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen sowie ein Assay zum Testen von Wirkstoffen, die auf Protein-Protein Wechselwirkungen einwirken. Der Nachweis solcher Protein-Protein Wechselwirkungen ist für die Aufklärung zellulärer Prozesse von großem Interesse. Außerdem ist es aus pharmazeutischer Sicht von zunehmender Bedeutung, Substanzen zu ermitteln, die solche Wechselwirkungen beeinflussen. Dabei gewinnen zunehmend Screening-Verfahren an Bedeutung, bei denen in großem Maßstab Wirkstoffe getestet werden. Diese müssen möglichst effektiv und kostengünstig sein und sollen in einem möglichst frühen Stadium der Wirkstoffforschung eingesetzt werden.

Protein-Protein Wechselwirkungen sind von zentraler Bedeutung für eine Vielzahl von zellbiologischen Vorgängen und liegen so unterschiedlichen Prozessen wie Rezeptor-Liganden Interaktionen, Signaltransduktionskaskaden, der Genexpression sowie einer Reihe anderer Prozesse zugrunde, wie beispielsweise Zelladhäsionsphänomenen, Antigen-Antikörper Interaktionen und vielen weiteren mehr. In diesem Sinne wird die Physiologie einer Zelle weitestgehend durch Protein-Protein Wechselwirkungen bestimmt. Dies impliziert aber auch, dass selbst geringfügigste Störungen von Protein-Protein Wechselwirkungen weitreichende Folgen für die normale Funktion einer Zelle haben können und somit auch Ursache für die Entstehung von Krankheiten sein können. Vor diesem Hintergrund ist es von zunehmendem Interesse, Methoden zu entwickeln mittels derer Protein-Protein Wechselwirkungen identifiziert und möglichst komplett analysiert werden können, und aufbauend darauf Verfahren zu entwickeln mit denen Substanzen

identifiziert werden können, die für therapeutische Applikationen mit Protein-Protein Wechselwirkungen interferieren.

Bei solchen Verfahren werden größtenteils automatisierte Massentestungen von Substanzbibliotheken auf einen biologischen Effekt gegen ein molekulares Zielprotein durchgeführt. Durch fortschreitende Miniaturisierung und verfeinerte Detektionstechniken erhöht sich der mögliche Probendurchsatz kontinuierlich, so dass mittlerweile der Begriff "High Throughput Screening" (HTS) verwendet wird.

Bei der zu testenden biologischen Aktivität eines Zielproteins handelt es sich zumeist um eine enzymatische Aktivität oder aber um die Fähigkeit, einen Effektor zu binden (Silverman *et al*, 1993). Zur Detektion einer Protein-Protein Wechselwirkung oder der Wirkung einer Substanz auf das Ausmaß einer Protein-Protein Wechselwirkung können verschiedene Verfahren eingesetzt werden, die sich zur Anwendung *in vivo* und/oder *in vitro* eignen. Generell zeichnet sich hierbei als Trend die Abkehr von radioaktiven hin zu fluoreszenzbasierten Methoden ab, die eine schnellere und präzisere Auswertung ermöglichen und gleichzeitig die Miniaturisierung eines Testverfahrens nicht limitieren.

Eine gängige Methode hierzu nutzt einen Energietransfer-Prozess zwischen den beiden Partnerproteinen aus, den sogenannten FRET-Effekt (fluorescence resonance energy transfer) (Clegg, 1995). Hierzu werden beide Proteine mit aufeinander bezüglich der Absorptions- und Emissionswellenlängen abgestimmten Fluorophoren versehen. Das Emissionslicht des einen Farbstoffs kann nun von dem anderen Farbstoff absorbiert werden, so dass längerwelliges Licht emittiert wird. Der FRET-Effekt ist aber nur dann möglich, wenn beide Proteine aneinander gebunden sind, so dass sich die Fluorophore in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Der Vorteil dieses Verfahrens ist die prinzipielle Anwendbarkeit *in vivo* mit verschiedenen Varianten des genetisch

- 3 -

codierten Fluorophors GFP (*green fluorescent protein*) (Mitra *et al*, 1996). Nachteil ist die Tatsache, dass sich der FRET-Effekt nur bei optimaler räumlicher Orientierung der beiden Fluorophore einstellt, die für ein Proteinpaar nur empirisch und unter großem Aufwand erreicht werden kann.

Eine zweite Methode ist die Fluoreszenz Polarisations-Spektroskopie (Nasir & Jolley, 1999). Werden fluoreszierende Moleküle in Lösung mit polarisiertem Licht angeregt, so hängt das Ausmaß, mit dem das emittierte Licht diese Polarisation beibehält, von der Schnelligkeit der Rotationsbewegung des Moleküls während der Fluoreszenz-Lebenszeit ab. Da diese Rotationsgeschwindigkeit und damit der Verlust an Polarisation umgekehrt proportional zum Molekulargewicht ist, kann dieser Effekt zur Unterscheidung eines freien Proteins von einem komplexierten Protein verwendet werden (Lynch *et al*, 1997). Eine Anwendung ist nur *in vivo* praktikabel.

Eine weitere Möglichkeit zur Detektion einer Protein-Protein-Wechselwirkung ist die Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie (FCS) (Eigen & Rigler, 1994), die prinzipiell auch in einem zellbasierten System einsetzbar ist. Hierbei definiert ein fokussierter Laserstrahl eine sehr kleine Volumeneinheit. Gemessen wird nun die Verweildauer einzelner Moleküle, die dieses Volumen passieren. Der Wert ist abhängig von der Diffusionsgeschwindigkeit des Moleküls, die wiederum umgekehrt proportional zum Molekulargewicht ist. Ein Fluorophor in einem binären Komplex würde also durchschnittlich eine längere Zeit zur Passage der Volumeneinheit benötigen und daher länger fluoreszieren als ein freies Fluorophor.

Zellbasierte Testsysteme werden zunehmend attraktiver für den Einsatz im *High-Throughput-Screening* (Silverman *et al*, 1998). Trotz der größeren Herausforderung an die Automatisierbarkeit,

Miniaturisierbarkeit und Messtechnologie haben sie den bedeutenden Vorteil gegenüber *in vitro* Assays, dass sich die Zielproteine in einer biologischen Umgebung befinden, die weitgehend der normalen physiologischen Situation entspricht. *In vivo* Systeme lassen daher bereits beim Primärscreening eingeschränkte Aussagen über Bioverfügbarkeit, pharmakokinetisches Verhalten und Toxizität einer Substanz zu. Dies bedeutet Zeit- und Kostenersparnis.

In vivo ist bislang noch kein universell anwendbarer und zugleich praktikables Bindungsassay etabliert worden, mit dem ein beliebiges Proteinpaar untersucht werden kann. Die FCS-Technik könnte dies zukünftig leisten, hat aber bislang noch nicht das Stadium breiter Anwendbarkeit erreicht und ist zudem instrumentell sehr aufwendig. Bei allen gängigen *in vivo* Methoden müssen beide Proteine unmittelbar hintereinander geschaltete Komponenten eines Signalwegs sein, dessen biologischer Effekt zur Detektion der Wechselwirkung ausgenutzt werden kann. Hierzu gehören die Ausschüttung von niedermolekularen Botenstoffen wie Calciumionen, cAMP und Inositoltriphosphat, deren Konzentrationsänderungen nach Aktivierung der entsprechenden Signalwege durch die Bindung beider Partnerproteine gemessen werden.

Führt der aktivierte Signaltransduktionsweg zur Transkription eines definierten Gens, so kann ein Reporter-genassay durchgeführt werden. Hierbei wird ausgenutzt, dass das Ausmaß der Bindung beider Proteine - so ist zumindest die Hypothese - mit dem Ausmaß der Aktivierung des Signalwegs und damit mit der Transkriptionsrate des entsprechenden Gens korreliert. Wird dessen Promotorsequenz mit der codierenden Sequenz eines Reporter-gens fusioniert, so kann stellvertretend die Expressionsrate des Reporterproteins gemessen werden. Ein solches Verfahren ist zum Beispiel das "Two-Hybrid-Verfahren" (Yang et al., 1995), bei dem die Interaktion zweier Proteine in Hefezellen getestet wird.

Der Nachteil der gängigen Zell-basierten Verfahren ist die Tatsache, dass die Bindung der beiden Partnerproteine nicht unmittelbar detektiert wird, sondern stets ein nachgeschalteter Effekt. Unspezifische Wechselwirkungen sowie der Einfluss anderer Signalproteine kann die Anzahl falsch positiver Ergebnisse erhöhen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Signalkomponenten blockiert wurden, die erst nach den beiden zu untersuchenden Partnerproteinen innerhalb des Signalwegs geschaltet sind. Bei den Reportergeren-Assays ergibt sich aufgrund der Genexpression zudem eine längere Zeitspanne, bis ein Effekt detektierbar ist.

Es wurde versucht, die Nachteile der oben beschriebenen Techniken durch Translokationsassays zu überwinden. Dabei wird der Transfer eines fluoreszenzmarkierten Proteins in einen subzellulären Bereich wie die Plasmamembran verfolgt (Barak *et al*, 1997). Das markierte Protein kann dann in seiner neuen Umgebung direkt visualisiert werden, ohne dass es erforderlich ist, einen Signalweg zu aktivieren.

Ein solches Translokationsassay wurde von Schneider *et al*. (1999, Nature Biotechn. 17, p170-175) entwickelt. Dabei werden in einer Zelle zwei Fusionsproteine expremiert. Das erste enthält eine potentielle Interaktionsdomäne und ein Kernlokalisierungssignal, das zweite eine potentielle Interaktionsdomäne und eine GFP-Domäne. Beide Proteine werden im Zytosol synthetisiert, wonach das erste Protein aufgrund seiner Signalsequenz in den Kern wandert. Wenn es jedoch durch die Interaktionsdomänen im Zytosol an das zweite Protein bindet, so wird das zweite Protein mit in den Kern transferiert und kann wegen der Fluoreszenz der GFP-Domäne dort nachgewiesen werden. Diese Technik ermöglicht es, Wechselwirkungen zwischen Proteindomänen *in vivo* zu ermitteln. Allerdings ist die Anwendbarkeit dieses Assays sehr stark eingeschränkt: Der Transport von Proteinen aus dem Zytosol in den

Zellkern erfolgt über den sogenannten Kernporenkomplex, einen membranübergreifenden Multiproteinkomplex aus acht Kopien von ca. 100 verschiedenen Proteinen (bei den höheren Eukaryoten) mit einem molekularen Gesamtgewicht von 125 MDa (Doye & Hurt, 1997; Obno *et al*, 1998; Gorlich & Kutay, 1999). Der Kerntransport erfolgt dabei nicht nur durch Zielsteuerung der Proteine mit Kernlokalisierungssignalen, sondern auch durch Diffusion (Talcott & Moore, 1999). Die Architektur des Kernporenkomplexes erlaubt prinzipiell Proteinen mit einem Durchmesser von bis zu ca. 9 nm den Durchlass durch Diffusion (Paine *et al*, 1975), was je nach Globularität des Proteins einem Molekulargewicht von 30-60 kDa entspricht. Beim aktiven, signalvermittelten Transport kann die Kernpore infolge umfangreicher Konformationsänderungen auf bis zu 25 nm geöffnet werden, so dass Partikel bis zu einer Masse von 25-50 MDa transportiert werden können. Somit kann das beschriebene Kerntranslokationsassay nur durchgeführt werden, wenn das zweite Protein als Fusion aus GFP und einem potentiellen Interaktionsprotein eine ausreichende Größe aufweist. Anderenfalls würde das Protein auch passiv in den Kern diffundieren, sowie nach erfolgter Translokation wieder aus dem Kern hinaus diffundieren. Die Beschränkung auf große Fusionsproteine ist insbesondere unvorteilhaft, weil die *in vivo* Expression von artifiziellen Proteinen umso fehleranfälliger ist, je größer diese sind. Insbesondere werden bei großen Proteinen aus mehreren Domänen häufig Faltungsschwierigkeiten beobachtet.

Das der Erfindung zugrundeliegende Problem ist es, ein Verfahren zur Bestimmung von Protein-Protein Wechselwirkungen bereitzustellen. Dieses Verfahren soll *in vivo* durchführbar sein und die Nachteile der Verfahren nach dem Stand der Technik überwinden. Insbesondere besteht das Problem darin, ein Verfahren bereitzustellen, das den direkten Nachweis einer Wechselwirkung ermöglicht, und daher keinen indirekten Nachweis über einen zusätzlichen Signalweg benötigt.

- 7 -

Außerdem soll das Verfahren für Proteine, Proteindomänen und Peptide beliebiger Größen anwendbar sein, und geeignet sein, im Rahmen von Assays eine große Anzahl von Interaktionspartnern oder von Substanzen, die die Protein-Protein Interaktion beeinflussen könnten, durchzutesten.

Das Problem wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zum Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen in Expressionssystemen wie Zellen, wobei ein Protein I mit einem Protein II interagiert, wobei ein Transfer des Protein I in ein Zellkompartiment erfolgt, in dem sowohl Protein I als auch Protein II natürlicherweise nicht vorkommen, und bei Nachweis von Protein II in dem Kompartiment, in das Protein I transferiert wurde, eine Wechselwirkung zwischen Protein I und Protein II festgestellt wird.

Das Zellkompartiment, in das der Transfer erfolgt, ist bevorzugt der Nukleus. Weitere zelluläre Kompartimente sind das Endoplasmatische Reticulum, der Nukleolus, die Lysosomen, der Golgi-Apparat, die Dictyosomen, Mitochondrien, Chloroplasten, Peroxisomen, Vakuolen, Endosomen, ein periplasmatischer Raum oder eine Membran.

Der Transfer des Protein I erfolgt vorzugsweise durch eine Signalsequenz, insbesondere durch eine Kernlokalisationssequenz. Das Protein II weist vorzugsweise ein Exportsignal, insbesondere ein Kernexportsignal auf. Weiterhin ist Protein II in einer bevorzugten Ausführungsform ein Fusionsprotein mit einem fluoreszierenden Protein, bevorzugt GFP.

Zelluläre Expressionssysteme umfassen, unter anderem, primäre Zellen oder immortalisierte Zelllinien. Ein zelluläres Expressionssystem kann vorzugsweise aus Zellen von Säugetieren, wie z.B. Zellen menschlicher

- 8 -

Herkunft, oder Zellen von Nagetieren (Maus, Ratte), aber auch aus anderen eukaryontischen Zellen, wie z.B. pflanzlichen Zellen, bestehen.

Erfindungsgemäß wird die Protein-Protein Wechselwirkung bevorzugt durch spektroskopische Detektion, Fluoreszenzdetektion, Colorimetrie oder Radiometrie nachgewiesen.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Assay unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei Substanzen hinzugefügt werden, die möglicherweise mit der Protein-Protein Wechselwirkung interferieren. Somit sind das erfindungsgemäße Verfahren und das Assay geeignet, Proteine oder Substanzen in großem Maßstab durchzutesten (screenen, HTS), die potentiell Protein-Protein Wechselwirkungen beeinflussen oder an diesen partizipieren. Darüber hinaus ist das erfindungsgemäße Verfahren dazu geeignet, mutmaßliche Protein-Protein Wechselwirkungen zu überprüfen. Aufgrund der hohen Sensitivität des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es auch möglich, dosis-abhängige Wirkungen von chemischen Substanzen auf Protein-Protein Wechselwirkungen zu untersuchen.

Überraschenderweise kann durch die Verbindung des Proteins II mit einem Kernexportsignal erreicht werden, dass ein Kernlokalisierungsassay *in vivo* mit Proteinen, Domänen oder Peptiden beliebiger Größen durchgeführt werden kann. Es wurde gefunden, dass bei Verwendung eines solchen Fusionsproteins als Protein II das Problem der unerwünschten Diffusion von Protein II in und (nach erfolgtem Transfer) aus dem Zellkern vermieden wird. Die erhaltenen Signale sind bei Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens und Assays außergewöhnlich kontrastreich. Somit lassen sich auch viel besser Untersuchungen durchführen, bei denen Wirkstoffe durchgetestet oder differentielle Unterschiede der Bindungsstärke quantitativ ermittelt werden.

Ziel dieser Erfindung war es, verschiedene Konstrukte der onkogenen Variante G12V von Ras und der Ras-bindenden Domäne der Raf-Kinase (RafRBD) herzustellen, die eine Fluoreszenzmarkierung erlauben bzw. mit dem genetisch kodierten Fluorophor GFP (*green fluorescent protein*) fusioniert sind und für Lokalisationsstudien und Translokationsstudien in der Zelle verwendet werden können. Schwerpunkt sollten Untersuchungen zur Translokation von Ras- und RafRBD-Konstrukten in den Zellkern sein. Ras sollte durch Fusion mit einem Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS) zur Akkumulation im Zellkern befähigt werden und damit in der Lage sein, RafRBD in den Zellkern zu transportieren. Hiernach sollte RafRBD ein Kernexportsignal (*nuclear export signal*, NES) erhalten. Die zentrale Fragestellung dabei lautete: Welche Faktoren bestimmen die subzelluläre Lokalisation zweier hochaffiner Partnerproteine, die ein NLS und ein NES tragen? Lässt sich die Zielsteuerung dieser Proteine, die Lokalisations-Sequenzen enthalten, durch Variation dieser Faktoren manipulieren? Eine weitere Aufgabe war es zu überprüfen, ob sich mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie eine scharf abgegrenzte Kolo-kalisation von Ras und einem RafRBD-GFP-Fusionsprotein an der Plasmamembran darstellen lässt. Hierdurch sollte die Grundlage für die Visualisierung Ras-abhängiger Signaltransduktion geschaffen werden, die mit der Translokation von Raf einhergeht. Als Praxisbezug bestand die Überlegung, mit einem nukleo-cytoplasmatischen oder membran-cytoplasmatischen Translokationssystem einen auf Fluoreszenz basierenden Ras-RafRBD-Bindungsassay in der lebenden Zelle zu etablieren. Es besteht Interesse an dem Einsatz eines solchen zellbasierten Testsystems in einem sog. *High-Throughput Screening* (HTS), also einem automatisierten Testverfahren mit hohem Probendurchsatz zur Suche nach Substanzen, die die Interaktion von onkogenem Ras und Raf blockieren oder alternativ die GTPase-Aktivität von onkogenem Ras stimulieren können. Eine wichtige Anforderung an

eine solche automatisierte Testmethode ist neben einem möglichst geringen präparativen Aufwand die Notwendigkeit der präzisen und verlässlichen Unterscheidbarkeit der beiden Situationen, in denen die Interaktion zwischen Ras und RafRBD entweder unbehindert oder aber geschwächt ist.

Untersuchungen der Kern-Transport-Signale:

Es wurde konstitutiv aktives H-Ras (G12V-Mutante) verwendet, bei welchem das C-terminale CAAX-Motiv, dass für die Anlagerung an die Plasmamembran (aa 1-174) verantwortlich ist, sowie die Ras-Bindedomäne von c-Raf1 (RafRBD, aa 51-132) fehlt. RafRBD bindet mit Affinität im nanomolaren Bereich an Ras-GTP und ist ausreichend aber notwendig für die Ras-Raf Interaktion (Scheffler et al., 1994; Herrmann et al., 1995). Um Ras gerichtet in den Kern zu transportieren, wurde ein modifizierter pcDNA3 Vektor (Invitrogen) konstruiert, der die Expression eines Proteins nach Wahl ermöglichte, das an eine 22 Aminosäuren umfassende Sequenz fusioniert ist, die das allgemein verwendete Kern-Lokalisations-Signal (NLS), abgeleitet aus dem *simian virus 40* large tumor antigen (SV40 T-ag), und eine vorhergesagte Phosphorylierungsstelle für Caseinkinase II (Ser111/112), für die gezeigt worden war, dass sie den Kernimport von SV40 T-ag stark zu erhöht, enthält. Die RafRBD Sequenz wurde in den pEGFP-C1 Vektor (Clontech) eingesetzt. Um das GFP-RafRBD in das Zytosol zu dirigieren, wurde das gut charakterisierte Kern-Export-Signal (NES), abgeleitet aus dem *HIV* Rev Protein (Fischer et al., 1995), an das C-terminale Ende fusioniert. Die Expression der verwendeten Konstrukte in NIH3T3 Fibroblasten wurde durch Western Blot Analysen bestätigt (Fig. 2A and 2B). Die Konstrukte für Ras und RafRBD wurden entweder allein oder zusammen transient exprimiert und die intrazelluläre Lokalisation der Proteine 12-48 Stunden nach der Transfektion mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops untersucht. Hierbei konnte die Funktionalität beider Signale, NLS und NES, gezeigt werden (Fig. 2C). Ras(G12V)-NLS

- 11 -

(genauso wie wt-Ras-NLS) aber nicht ein Kontrollkonstrukt, dem das NLS fehlt, ist vollständig im Kern akkumuliert. GFP-Raf-RBD-NES war ausschließlich im Zytosol lokalisiert. Ein Konstrukt ohne NES zeigte eine gleiche Verteilung der Fluoreszenz wie GFP, etwas stärker akkumuliert im Kern. Aufgrund dieser unvoreilhaftigen Eigenschaften des GFP, ist die Verwendung eines einzelnen NLS in einem Translokationssystem nicht ausreichend, eine klare, interaktionsabhängige Unterscheidung der Fluoreszenzintensitäten zwischen Kern und Zytosol zu erzeugen. Die gemeinsame Transfektion von Ras(G12V)-NLS und GFP-RafRBD führt zu einer vollständig deckungsgleichen Lokalisation beider Proteine innerhalb des Kerns, was vermuten läßt, dass beides, die Ras*RafRBD Interaktion und das verwendete NLS stark genug sind für eine vollständige Kern-Trans-Lokalisation des GFP-RafRBD. Unerwartet führte die gemeinsame Transfektion von Ras(G12V)-NLS und GFP-RafRBD-NES nicht zu einer Translokation des Letzeren in den Kern. Vielmehr war GFP-RafRBD-NES vollständig im Zytosol lokalisiert, trotz der andauernden Anwesenheit von Ras(G12V)-NLS innerhalb des Kerns. Aus diesen Experimenten ist zu schließen, dass das verwendete NES über die Stärke der Protein-Protein Interaktion dominiert. Deshalb wurde die Stärke des Kern-Export-Signals im GFP-RafRBD-NES fein abgestimmt.

Feinabstimmung des NES Signals:

Zhang and Dayton (1998) hatten eine Reihe von Rev Protein Klonen, die an verschiedenen Positionen innerhalb des NES zufällig mutiert waren, erzeugt und deren abgeschwächte Kern-Export-Aktivität bestimmt. Es wurden fünf unterschiedlich mutierte NES Sequenzen, die ungefähr 50, 30, 16, 8 und 2% Kern-Export-Aktivität im Vergleich zum wt-Rev zeigten, ausgewählt. Diese wurden in die Sequenz des GFP-RafRBD-NES eingebaut (Fig. 3A). Die gemeinsame Transfektion von Ras(G12V)-NLS und den mutierten GFP-RafRBD-NES-Konstrukten zeigte, dass eine Reduktion der Exportaktivität auf 8% die GFP Fluoreszenz noch im Zytosol akkumulieren ließ und einer Anziehung des nukleären

- 12 -

Ras(G12V)-NLS entgegenwirkte. Einzig GFP-RafRBD-NES2%, mit einer deutlich abgeschwächten Exportaktivität war vollständig innerhalb des Kernes mit Ras(G12V)-NLS deckend lokalisiert (Fig. 3B). Einzeln transfiziertes GFP-RafRBD-NES2% war gleichmäßig im Kern und Zytosol verteilt, und zwar signifikant weniger stark angereichert innerhalb des Kern als GFP-RafRBD ohne NES. Die anderen GFP-RafRBD-NES Mutanten mit 8% oder höherer Exportaktivität waren vollständig innerhalb des Zytosols lokalisiert. Diese Experimente verdeutlichten, dass GFP-RafRBD-NES2%, aufgrund seines relativ geringen Molekulargewichtes von 38 kDa, einem ausbalanzierten Gleichgewicht zwischen schwachem signalgesteuerten Kernexport und freier Diffusion durch den Kernporenkomplex unterliegt.

Kontrolle der freien Diffusion des NES Konstrukts:

Um die freie Diffusion von RafRBD zu minimieren und dabei den Readout des Assays zu optimieren wurde, das Molekulargewicht von GFP-RafRBD-NES durch das Hinzufügen von zwei weiteren GFP Einheiten erhöht. Trotz seines Molekulargewichts von 84 kDa, das eine Diffusion in den Kern verhindern sollte, fand sich GFP3 immer noch signifikant angereichert im Kern. Dieser Umstand weist darauf hin, dass GFP ein kryptisches NLS enthält (Fig. 4A-C). Die Expression von GFP3-RafRBD-NES2% resultierte in der erwarteten Anreicherung im Zytoplasma. Nach Kotransfektion mit Ras(G12V)-NLS wurde in der Tat eine Kolokalisation beider Proteine im Kern beobachtet. Mit diesen zwei Konstrukten von Ras und RafRBD ist man in der Lage, den gewünschten Readout, wie in Fig. 1 dargestellt, zu erreichen. Um herauszufinden, ob die Translokation von RafRBD in den Kern durch aktiven Transport des Ras-NLS*GFP-RafRBD Komplexes vermittelt wird, oder eher durch die Diffusion von RafRBD durch den Kernporenkomplex und anschließendes Trappen durch nukleäres Ras-NLS, wurde ein GFP-Fusionskonstrukt mit vollständigem c-Raf1 verwendet. Sollte Diffusion der alleinige Transportmechanismus sein, sollte nach Koexpression mit Ras-NLS keine Kernlokalisierung von

GFP-Raf-NES2% beobachtet werden, weil Raf1 ein großes 80 kDa Protein ist, das mit weiteren regulatorischen Proteinen komplexiert ist (Morrison & Cutler, 1997). Koexprimiertes GFP-Raf-NES2% war vorwiegend im Kern akkumuliert (Fig. 4C) und deshalb kann gefolgert werden, dass die Translokation durch aktiven Transport des Ras-Raf Komplexes vermittelt wird. Diese Daten zeigen ebenso, dass der Translokationsassay auch für die Untersuchung von Ras und Raf und möglicherweise auch für die Regulation der Raf Aktivität in Säugerzellen geeignet ist.

Korrelation zwischen Komplexaffinität / Komplexkonzentration und Kernfluoreszenz: Um Ras-Raf Affinität mit dem Ausmaß der Kernakkumulation von GFP-RafRBD zu korrelieren, wurde ein Set von RafRBD Mutanten verwendet. Hierzu mußten Kern- und Zytoplasma Fluoreszenzintensitäten quantifiziert werden. Frühere Untersuchungen mit diesen Mutanten ergaben, dass die Affinität der Ras-RafRBD Interaktion in vivo mit der MAP Kinase Signaltransduktionskaskade in Verbindung gebracht werden kann. Wie erwartet, war RafRBD(R89L) mit einer $\sim 10^4$ -fachen Reduktion in der Affinität nicht kolokalisiert mit Ras(G12V)-NLS und zeigte die gleich niedrige Fluoreszenzintensität innerhalb des Kerns wie alleine exprimiertes RafRBD. Da es zur Zeit keinen effektiven Antagonisten der Ras-Raf Interaktion gibt, simuliert die Kotransfektion dieser Mutante den Readout der für eine komplette Inhibition dieser Interaktion erwartet wird. Mit abnehmender Ras-RafRBD Affinität erniedrigt sich die durchschnittliche Prozentigkeit der Kernfluoreszenz, wie für die RafRBD Mutanten K65M, N64A, V69A, T68A, R59A, Q66A und K84A gezeigt (Fig. 5A and 5B). Allein exprimiert zeigten diese RafRBD Konstrukte dieselbe Akkumulation im Zytoplasma wie die Wildtypform. Im Gegensatz dazu waren die allein exprimierten Mutanten K65A, K65E und R67A im Kern signifikant angereichert und konnten deshalb nicht für Vergleichstudien herangezogen werden. Diese durch nur eine einzige Aminosäureveränderung verursachte Verschiebung in der subzellulären Lokalisation könnte durch die

abgeschwächte Bindung des Exportkomplexes zu seinem Cargo zustande kommen. Diese Untersuchungen machen deutlich, dass der anscheinend niedrigere Detektionslevel des beschriebenen Assays mit einer 5-fachen Reduktion in der Ras-Raf Affinität korrespondiert und potentiell mit stabil transfizierten Zelllinien und einer optimierten Quantifizierungssoftware weiter verbessert werden kann.

Der primäre Defekt von onkogenen Ras Mutanten ist deren Unfähigkeit, sowohl in der Gegenwart als auch Abwesenheit von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs), GTP zu hydrolysieren. Unter Berücksichtigung, dass der katalytische Effekt der GTPase Stimulation durch GAPs mit der Beteiligung eines Arginin-Fingers von GAP zusammenhängt, wurde argumentiert, dass die Stimulation der GTPase Reaktion von onkogenem Ras in Ras-abhängigen Tumoren ein anti-Krebs Zielmolekül darstellen würde (Scheffzek et al., 1997). Neuerliche Untersuchungen mit einem GTP Analogon haben die Idee unterstützt, dass kleine Moleküle, die die GTPase Reaktion induzieren würden, bevorzugte Leadstrukturen für die Medikamentenentwicklung sein würden. Von daher stellt sich die Frage, ob der GFP-RafRBD Translokationsassay geeignet wäre, um solche Verbindungen zu detektieren. Wenn Wildtyp Ras-NLS mit GFP-RafRBD-NES2% co-transfiziert wird, findet sich die GFP Fluoreszenz hoch angereichert im zytoplasmatischen Kompartiment (Fig. 5A). Das deutet darauf hin, dass wegen GTP-Hydrolyse der Anteil an Komplexbildung zwischen Ras und Raf stark reduziert ist und dass der Assay geeignet ist die GTPase Reaktion aufzuzeichnen.

Es wurde gezeigt, dass das erfindungsgemäße Verfahren es ermöglichte eine Protein-Protein Interaktion direkt zu überwachen (monitoren). Ebenfalls wurde untersucht, ob dieses Verfahren allgemein anwendbar ist auf andere Protein-Protein Interaktionen. Als Proteinpaare wurden Ras und RaIGDS, Cdc42 und WASP und Grb2 und Sos1 ausgewählt. Die

- 15 -

Expression der in Fig. 6A mit den zugehörigen Molekulargewichten dargestellten Konstrukte wurde durch Western Blot Analyse bestätigt (Fig. 6B). Wurden Cdc42-NLS (G12V und wt) und Grb2-NLS allein exprimiert, so waren sie ausschließlich im Kern lokalisiert, während GFP3-RalGDSRBD-NES2%, GFP3-WASP-CRIB-NES2% und GFP3-Sos1(C-ter)-NES2% im Zytosol akkumulierten. Im Gegensatz dazu waren GFP3-RalGDSRBD-NES2% vorwiegend, und die anderen zwei GFP-Fusionsproteine vollständig, nach gemeinsamer Transfektion mit ihren entsprechenden NLS-enthaltenen Interaktionspartnern (Fig. 6C), im Kern lokalisiert. Für die P49L Mutation innerhalb der N-terminalen SH3 Domäne von Grb2 ist bekannt, dass sie die Interaktion mit Sos1 verhindert (Chardin *et al.*, 1993). Dieser Sachverhalt konnte bestätigt werden durch den Nachweis, dass die Kernlokalisierung der GFP-Fluoreszenz verhindert wird. Ähnlich zu dem, was für RafRBD beobachtet wurde (Fig. 5), ist wt-Ras-NLS nicht imstande RalGDSRBD deutlich zu translozieren, ebenso kann WASP-CRIB von wt-Cdc42-NLS nicht umorientiert werden. Diese Daten unterstreichen, dass der erfindungsgemäße Assay es allgemein ermöglicht, zwischen GTPase-negativ und wt-Formen von kleinen GTP-bindenden Proteinen zu unterscheiden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann für zell-basierende Wirkstoffdurchmusterungssuchmethoden nach Antagonisten von Proteininteraktionen angewendet werden und mag, nach entsprechender Modifikation, ebenfalls anwendbar sein für die Suche nach Agonisten. Ein enormer Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, die Interaktion direkt und reversibel nachzuweisen, wodurch die Menge an Falschpositiven in einer Wirkstoffdurchmusterungssuche beträchtlich reduziert wird. Allerdings könnten auch kleine Moleküle identifiziert werden, die die Kern-Transport-Maschinerie blockieren und so alternativ zu einer Abschwächung der nukleären GFP-Fluoreszenz führen würden. Derartige Moleküle, die ebenfalls von besonderem Interesse sind, könnten einfach

durch Immunnachweis des NLS-enhaltenen Proteins, welches ebenfalls nicht mehr im Kern lokalisiert wäre, identifiziert werden. Letztendlich unterstützen die einfachen experimentellen Bedingungen des erfindungsgemäßen Verfahrens eine einfache automatisierte Quantifizierung und hohen Durchsatz. Aufgrund seiner Sensitivität werden mit diesem Verfahren nicht nur quantitative Informationen über wirkstoffaktive Substanzen, sondern möglicherweise auch mechanistische Untersuchungen über die Proteininteraktionen und deren Regulation, z.B. Struktur-Funktionsuntersuchungen durch Anwendung von Punktmutationen oder Analyse der Nukleotidhydrolyse von GTP-Bindeproteinen, ermöglicht. Eine weitere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens, unter Verwendung des Prinzips der Kern-Zytosol-Translokation, könnte ein alternatives „Säuger-Two-Hybrid-Verfahren“ zur Verifizierung möglicher Interaktionen oder zur Durchmusterungssuche von unbekannten Interaktionspartnern einzelner Proteine, oder gar einer kompletten genetischen Expressions-Bibliothek sein.

Abbildungen

Fig. 1: Schematische Darstellung von **NIFTY**: Ein fluoreszenz-basierter Protein-Protein Interaktionsassay auf der Basis einer Kern-Zytoplasma Translokation von Reporterfluoreszenz.

Fig. 2: Konstruktion und Expression von Fusionsproteinen für die Initialstudien. (A) Schematische Darstellung der hergestellten Konstrukte. (B) Immunoblots der initialen Konstrukte nach transienter Expression in NIH3T3 Zellen. Hierzu wurden Zellysate auf 15% SDS Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Membranen transferiert und mit anti-GFP or anti-HA Antikörpern angefärbt. (C) Intrazelluläre Lokalisierung der initialen Ras und RafRBD Konstrukte nach Expression

- 17 -

in NIH3T3 Zellen. Hierzu wurden die Proben mit einem Leica TCS SP2 konfokalen Mikroskop und einem 63x Ölimmersionsobjektiv gescanned. Für die Immunlokalisierung von HA-markiertem Ras wurden fixierte und permeabilisierte Zellen mit anti-HA Antikörpern und Cy5 (Co-Lokalisierungsstudien) bzw. Cy3 (Einzelexpression) markierten Sekundärantikörpern markiert. Obere Abbildungsreihe: subzelluläre Lokalisierung von einzel exprimiertem Ras(G12V)-NLS (a), der Ras Kontrolle (b), GFP-RafRBD-NES (c), GFP and GFP-RafRBD (d). Unterer Abbildungsblock: subzelluläre Lokalisierung von Ras(G12V)-NLS nach Co-expression mit GFP-RafRBD or GFP-RafRBD-NES. Zu beachten: für jedes Co-expressionsexperiment werden drei Darstellungen gezeigt: eine für das GFP Signal (grün), eine für das HA-Signal (blau) sowie eine überlappende Darstellung beider Signale.

Fig. 3: Feinabstimmung der NES Stärke. (A) Schematische Darstellung des Pools der hergestellten GFP-RafRBD-NES Konstrukte mit abgeschwächten Exportsignalen. Veränderungen der Aminosäuren des NES sind mit rot markiert. Die angegebenen prozentualen NES-Aktivitäten beziehen sich auf die Exportaktivität von NES-mutiertem Rev Protein im Vergleich zu Wildtyp-Rev (Zhang & Dayton, 1998). (B) Intrazelluläre Lokalisierung von GFP-RafRBD-NES2% nach Einzelexpression (a) und von Ras(G12V)-NLS und GFP-RafRBD-NES2% nach Co-Expression.

Fig. 4: Feinabstimmung der Eigenschaft von GFP-RafRBD, durch den nukleären Porenkomplex zu diffundieren. (A) Schematische Darstellung des Konstrukts GFP3-RafRBD-NES2%. (B) Immunoblots von GFP, GFP2, GFP3 and GFP3-RafRBD-NES2% nach transienter Expression in NIH3T3 Zellen. (C) Intrazelluläre Lokalisierung von GFP3, GFP3-RafRBD-NES2% (a) and GFP3-Raf-NES2% (b) nach Einzelexpression und von Ras(G12V)-NLS nach Co-expression mit entweder GFP3-RafRBD-NES2% oder GFP3-Raf-NES2%. Zu vergleichen ist hier die inverse subzelluläre

Lokalisierung der Reporterfluoreszenz im zweiten und dritten Bild der unteren Abbildungshälfte mit jener in Fig. 1.

Fig. 5: Korrelation der Menge an nukleärer Akkumulation von GFP3-RafRBD-NES2% and Ras**RafRBD* Affinität oder Komplexkonzentration. (A) Co-expression von Ras(G12V)-NLS mit verschiedenen Konstrukten von GFP3-RafRBD-NES2% mit den jeweils angegebenen Punktmutationen. Unterer Abbildungshälfte: Co-expression von wt-Ras-NLS and GFP3-RafRBD-NES2%. (B) Korrelation der Ras**RafRBD* Bindungsaffinität und dem Ausmaß an nukleärer Akkumulation von Reporterfluoreszenz. Dargestellt ist die relative Kernfluoreszenz gegen den Logarithmus der Dissoziationskonstante des wt-Ras**RafRBD* Komplexes (Block *et al.*, 1997).

Fig. 6: Generelle Anwendung von NIFTY für andere interagierende Proteine. (A) Schematische Darstellung der generierten Konstrukte. (B) Immunoblot Analyse der indizierten Konstrukte nach Expression NIH3T3 Zellen. (C) Intrazelluläre Lokalisierung von einzel expremiertem GFP3-RaIGDSRBD-NES2% (a), GFP3-WASP-CRIB-NES2% (b) oder GFP-SOS(C-ter)-NES2% (c) oder von den indizierten Konstrukten nach Co-expression.

Beispiel 1

Die der Erfindung zugrundeliegenden wesentlichen Arbeiten wurden am Beispiel des kleinen GTP-bindenden Proteins Ras und seinem hauptsächlichen Effektor Protein Raf Kinase durchgeführt, obwohl die Erfindung auf jedes andere interagierende Proteinpaaar angewandt und ausgedehnt werden kann.

Das Ras-Protein ist ein zentrales Glied verschiedener Signaltransduktionswege, die Wachstums- und Differenzierungsprozesse

regulieren. Als GTP-bindendes Protein nimmt es die Funktion eines regulierten molekularen Schalters ein. Ras wechselt dabei zwischen zwei Zuständen, in denen es entweder GTP gebunden hat (Schalterstellung: ein), oder das GTP zu GDP hydrolysiert ist (Schalterstellung: aus). Das aktivierte Ras kann nun die Serin-Threonin-Kinase Raf (*rapid fibrosarcoma*), den am besten charakterisierten Effektor von Ras, an die Plasmamembran rekrutieren, was zur Aktivierung dieser Kinase führt. Raf kann nun seinerseits durch Phosphorylierung die Proteinkinase MEK (*MAPK/Erk-Kinase*) aktivieren, die dann wiederum die Proteinkinase Erk (*extracellular-signal-related kinase*) aktiviert. Diese drei in Reihe geschalteten Kinasen bilden das sogenannte MAP-Kinase-Modul (für *mitogen activated protein*). Die Aktivierung dieses Moduls führt zur Phosphorylierung mehrerer Transkriptionsfaktoren und schließlich zur Expression verschiedener Gene (Campbell *et al*, 1998).

Die Tatsache, dass in 20-30% aller menschlichen Tumoren Punktmutationen im *ras*-Protoonkogen gefunden werden (Barbacid, 1987), unterstreicht die bedeutende Funktion von Ras bei der Kontrolle des Zellwachstums. Diese Punktmutationen führen allesamt zum Verlust der GTPase-Aktivität von Ras, die auch in Gegenwart von GTPase aktivierenden Proteinen (GAP) nicht mehr angeregt werden kann. Da der Wechsel von der GTP-gebundenen Form zur GDP-Form blockiert ist, kommt es zu einer Akkumulation von aktivem Ras und damit zu einem permanenten wachstumsstimulierenden Signal in der Zelle. Große Anstrengungen wurden unternommen, um die molekularen Grundlagen der Schalterfunktion von Ras-Proteinen zu verstehen und gegen onkogenes Ras gerichtete Antitumor-Medikamente zu entwickeln.

Die Interaktion von Raf mit aktiviertem Ras geschieht über die Ras-bindende Domäne (RBD) im regulatorischen N-Terminus von Raf (Vojtek *et al*, 1993), die ein unabhängig faltendes, stabiles Modul aus 80 Aminosäuren darstellt (Scheffler *et al*, 1994).

Die isolierte RBD vermag Ras in gleicher Weise GTP-abhängig zu binden wie vollständiges Raf. Zudem sind Ras-Varianten mit Punktmutationen in der Effektorregion, die zur Blockierung der biologischen Ras-Aktivität führen, gleichfalls nicht in der Lage, mit der RBD zu interagieren. Aus diesem Grund wird angenommen, dass die isolierte RafRBD die gleichen Eigenschaften hat wie die Domäne im intakten Gesamtprotein (Koide *et al*, 1993; Van Aelst *et al*, 1993; Moodie *et al*, 1993).

Experimentelle Durchführung

Plasmide: pcDNA3-HA-CKII-NLS wurde durch die Inserierung eines HindIII/KpnI Fragments, welches eine Kozak-Sequenz, ein Startkodon und eine Sequenz kodierend für das Hämagglutinin-Epitop (YPYDVPDYA) beinhaltet, und eines EcoRI/XhoI Fragments, welches für die Casein Kinase II Phosphorylierungsstelle (SSDDEATADSQHSST) und der Kernlokalisierungssequenz (NLS) (PPKKKRKV) des SV40 T-ag, in die Klonierungsstelle des Plasmidvektors pcDNA3 (Invitrogen) erstellt. PCR-amplifizierte Sequenzen von H-Ras (aa 1-174), hCdc42 (aa 1-178) und hGrb2 wurden in die BamHI/EcoRI-Schnittstelle von pcDNA3-HA-CKII-NLS kloniert. Das Ras-Kontrollkonstrukt wurde hergestellt, indem die H-Ras Sequenz mit einem Stopkodon in das Plasmid pcDNA3-HA, welchem die zweite Sequenzinsertion fehlt, kloniert wurde. Die G12V Mutationen wurden mittels gerichteter Mutagenese hergestellt. Ein für die Ras Bindedomäne (aa 51-132) kodierendes c-Raf1 Fragment wurde mittels PCR amplifiziert und in die XhoI/EcoRI-Schnittstelle von Plasmid pEGFP-C1 (Clontech) kloniert (pGFP-RafRBD). Um das Plasmid pGFP-RafRBD-NES zu generieren, wurde mittels eines 3'-überlappenden Primers die für das Kernexportsignal (NES) des Rev Proteins kodierende Sequenz in das Plasmid pGFP-RafRBD eingefügt. Punktmutationen innerhalb der NES Sequenzen (siehe Abbildung 3A) wurden im gleichen Verfahren hergestellt. Das Plasmid pEGFP3-C1-NES2% ermöglicht die Expression von Proteinen mit einer N-terminalen Fusion von drei Einheiten GFP und ebenso mit einer C-terminalen Fusion eines attenuierten NES Proteins.

- 21 -

PEGFP3-C1-NES2% wurde hergestellt, indem nachträglich in das pEGFP-C1 Plasmid ein NheI/AgeI- und ein AgeI/AgeI/-Fragment von GFP, jeweils eine Kozak-Sequenz beinhaltend, und ein für ein stark attenuiertes Rev protein NES (LPPLERLETLD) kodierendes EcoRI/PstI-Fragment eingefügt wurden. Zur Herstellung der GFP-Fusionskonstrukte (siehe Abbildung 6A) wurden PCR-amplifizierte Sequenzen von hRalGDS-RBD (aa 788-884), hWASP-CRIB (aa 221-257) und dem C-terminalen Bereich von hSOS1 (aa 1132-1333) in die XhoI/EcoRI - Restriktionsschnittstelle von pEGFP3-C1-NES2% eingefügt. Die Konstruktion des Plasmids pGFP3-RafRBD-NES2% erfolgte durch die Subklonierung des XhoI/PstI Fragments von pGFP-RafRBD2% in das Plasmid pEGFP3-C1-NES2%. Mutationen in der RafRBD kodierenden Sequenz wurden mittels gerichteter Mutagenese erzeugt. Alle Konstrukte wurden abschließend sowohl vom 5'-Ende als auch vom 3'-Ende ausgehend sequenziert, wodurch die korrekte Basenabfolge bestätigt werden konnte.

Zellkultur, transiente Transfektion und Immunfluoreszenzfärbung: NIH3T3 Zellen wurden in mit 10% Kälberserum supplementiertem DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) mit Penicillin (1000 IU/ml), Streptomycin (1000 µg/ml) bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 7,5% kultiviert. Gleiche Kulturbedingungen herrschten auch für MDCK und 293 Zellen. Für die transiente Transfektion wurden Zellen auf 21x26 mm Deckgläschen in 6-well Gewebekulturschalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert. Die Transfektion erfolgte mit LipofectAMINE PLUS - Reagenz (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers unter Verwendung von 0,4 µg pcDNA3-Plasmid und 0,7 µg pEGFP-Plasmid. Für den immuncytochemischen Nachweis von Proteinen wurden die Zellen in Waschpuffer gewaschen (PBS, 0,5 mM CaCl₂, 0,25 mM MgCl₂), für 15 min in 3,7% Formaldehyd fixiert und für 10 min in 0,1% Triton X-100 in Tris/HCl pH 7,5 und 100 mM NaCl permeabilisiert. Nach einer 20 minütigen Inkubation mit 3% BSA wurden die Zellen mit

dem primären Antikörper (Ratte, anti-HA; Sigma) in einer Verdünnung von 1:100 für 1 h inkubiert, anschließend dreimal mit PBS gewaschen und mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (Cy-3 oder Cy-5, Ziege, anti-Ratte; Dianova) in einer Verdünnung von 1:100 für 1 h inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten drei Waschschrte mit PBS. Die Deckgläschen wurden mit Mowiol auf Objektträgern eingebettet.

Western Blot Analyse: NIH3T3 Zellen auf einer 10 cm – Gewebekulturschale wurden 48 h nach Transfektion mit entsprechenden Plasmidkonstrukten in Lysepuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 0,1% SDS, 1% NaDOC und Proteinaseinhibitoren) inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Gummispatel von den Schalen abgelöst. Nach Zentrifugation bei 4°C für 10 min bei 22000 g wurde der Überstand in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membranen wurden im Anschluss entweder mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Ratten anti-HA Antikörper (Sigma) oder mit Kaninchen anti-GFP Antikörper (Dianova) eine Stunde lang inkubiert. Die mit dem anti-GFP Antikörper inkubierten Membranen wurden gewaschen und anschließend mit sekundärem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten anti-Kaninchen Antikörper (Amersham Pharmacia) inkubiert. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde ein ECL Chemilumineszenz-Substrat (Pierce).

Imaging und Quantifizierung: Proben wurden mit einem konfokalen Mikroskop (Leica TCS SP2) analysiert. Durch eine sequentielle Abrasterung benachbarter Bildfelder wurden mehrere zelluläre Bildaufnahmen für jede Probe erhalten. Aufgrund der zu erwartenden Schwankungen der Proteinexpression in transienten Transfektionsexperimenten wurde vor der Bildanalyse eine Auswahl der zu aufzunehmenden Zellen getroffen. Die Überexpression eines Proteins kann zu einer schnellen Sättigung der Anreicherung des Proteins in

einem entsprechenden Kompartiment führen, so dass es auch zu einer unerwünschten Anreicherung des Proteins in benachbarten Kompartimenten kommen kann. Aus diesem Grund wurden nur solche Zellen berücksichtigt, deren Fluoreszenzintensität unterhalb eines definierten Schwellenwertes für beide Fluorophoren lag. Ebenso fanden nur solche Zellen Berücksichtigung, die eine vergleichbare Expressionsrate beider Proteine aufwiesen. Diese Expressionsraten wurde mittels eines Quotienten der GFP- und Cy5-Fluoreszenzintensitäten im Kern und im Zytoplasma bestimmt. In jedem Experiment wurden mindestens 50 Zellen analysiert, die die gegebenen Auswahlkriterien erfüllten. Eine Fokussierung auf die Equatorialebene des Zellkerns und die Festlegung der Kompartimentgrenzen innerhalb derer die Bildanalyse erfolgen sollte, wurde durch die Cy5-Färbung des Kernlokalisierungssignal-tragenden Proteins ermöglicht. Die Zytoplasma-Fläche wurde durch zwei eng beieinander liegende Ringe in der Nähe der Grenze zum Zellkern definiert. Sowohl für das GFP- als auch für das Cy5-Signal wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität pro Fläche gemessen und daraus die prozentuale Intensität des Kernsignals ermittelt.

Die zur Durchführung der hier beschriebenen Experimente notwendigen molekularbiologischen Methoden sind dem Fachmann bekannt (siehe Sambrook und Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2000).

Literaturverzeichnis

- Ahmadian,M.R. *et al.* Guanosine triphosphatase stimulation of oncogenic Ras mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 7065-7070 (1999).
- Aronheim,A. Improved efficiency sos recruitment system: expression of the mammalian GAP reduces isolation of Ras GTPase false positives. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3373-3374 (1997).
- Aronheim,A., Zandi,E., Hennemann,H., Elledge,S.J. & Karin,M. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3094-3102 (1997).
- Aspenstrom,P., Lindberg,U. & Hall,A. Two GTPases, Cdc42 and Rac, bind directly to a protein implicated in the immunodeficiency disorder Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr. Biol.* **6**, 70-75 (1996).
- Barbacid,M. ras genes. *Annual Reviews of Biochemistry* **56**, 779-827 (1987).
- Block,C. *et al.* Quantitative structure-activity analysis correlating Ras/Raf interaction in vitro to Raf activation in vivo. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 244-251 (1996).
- Bos,J.L. All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO J.* **17**, 6776-6782 (1998).
- Bos,J.L. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **49**, 4682-4689 (1989).
- Buday,L. & Downward,J. Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* **73**, 611-620 (1993).

Burbelo,P.D., Drechsel,D. & Hall,A. A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* **270**, 29071-29074 (1995).

Campbell,S.L. *et al.* Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* **17**, 1395-1413 (1998).

Chardin,P. *et al.* Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* **260**, 1338-1343 (1993).

Clegg,R.M. Fluorescence Imaging Spectroscopy and Microscopy. Wang,X.F. & Herman,B. (eds.), pp. 179-252 (Wiley,1996).

Cochran,A.G. Antagonists of protein-protein interactions. *Chem. Biol.* **7**, R85-R94 (2000).

Colas,P. & Brent,R. The impact of two-hybrid and related methods on biotechnology. *Trends Biotechnol.* **16**, 355-363 (1998).

Downward,J. Ras signalling and apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 49-54 (1998).

Drees,B.L. Progress and variations in two-hybrid and three-hybrid technologies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 64-70 (1999).

Egan,S.E. *et al.* Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* **363**, 45-51 (1993).

Ehrhard,K.N., Jacoby,J.J., Fu,X.Y., Jahn,R. & Dohlman,H.G. Use of G-protein fusions to monitor integral membrane protein-protein interactions in yeast. *Nat. Biotechnol.* **18**, 1075-1079 (2000).

- Fearon, E.R. *et al.* Karyoplasmic interaction selection strategy: a general strategy to detect protein-protein interactions in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 7958-7962 (1992).
- Fields, S. & Song, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246 (1989).
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W. & Luhrmann, R. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**, 475-483 (1995).
- Gail, R., Costisella, B., Ahmadian, M.R. & Wittinghofer, A. Ras-mediated cleavage of a GTP analogue by a novel mechanism. *Chembiochem* **2**, 570-575 (2001).
- Herrmann, C., Horn, G., Spaargaren, M. & Wittinghofer, A. Differential interaction of the ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.* **271**, 6794-6800 (1996).
- Herrmann, C., Martin, G.A. & Wittinghofer, A. Quantitative analysis of the complex between p21ras and the Ras-binding domain of the human Raf-1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 2901-2905 (1995).
- Huang, L., Hofer, F., Martin, G.S. & Kim, S.H. Structural basis for the interaction of Ras with RalGDS. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 422-426 (1998).
- Johnsson, N. & Varshavsky, A. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10340-10344 (1994).
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. & Ladant, D. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5752-5756 (1998).

- 27 -

Koide,H. Satoh,T. Nakafuku,M. & Kaziro,Y. GTP-dependent association of Raf-1 with Ha-Ras: identification of Raf as a target downstream of Ras in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8683-8686 (1993).

Leanna,C.A. & Hannink,M. The reverse two-hybrid system: a genetic scheme for selection against specific protein/protein interactions. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3341-3347 (1996).

Li,N. *et al.* Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* **363**, 85-88 (1993).

Mendelsohn,A.R. & Brent,R. Protein interaction methods - toward an endgame. *Science* **284**, 1948-1950 (1999).

Moodie,S.A., Willumsen,B.M., Weber,M.J. & Wolfman,A. Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* **260**, 1658-1661 (1993).

Morrison,D.K. & Cutler,R.E. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 174-179 (1997).

Nobes,C.D. & Hall,A. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 456-459 (1995).

Pelletier,J.N., Campbell-Valois,F.X. & Michnick,S.W. Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12141-12146 (1998).

Remy,I. & Michnick,S.W. Clonal selection and in vivo quantitation of protein interactions with protein-fragment complementation assays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 5394-5399 (1999).

- Rohatgi,R. *et al.* The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**, 221-231 (1999).
- Rossi,F., Charlton,C.A. & Blau,H.M. Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by beta-galactosidase complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 8405-8410 (1997).
- Rossi,F.M., Blakely,B.T. & Blau,H.M. Interaction blues: protein interactions monitored in live mammalian cells by beta-galactosidase complementation. *Trends Cell Biol.* **10**, 119-122 (2000).
- Rozakis-Adcock,M., Fernley,R., Wade,J., Pawson,T. & Bowtell,D. The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* **363**, 83-85 (1993).
- Rudolph,M.G. *et al.* The Cdc42/Rac interactive binding region motif of the Wiskott Aldrich syndrome protein (WASP) is necessary but not sufficient for tight binding to Cdc42 and structure formation. *J. Biol. Chem.* **273**, 18067-18076 (1998).
- Scheffler,J.E. *et al.* Characterization of a 78-residue fragment of c-Raf-1 that comprises a minimal binding domain for the interaction with Ras-GTP. *J. Biol. Chem.* **269**, 22340-22346 (1994).
- Scheffzek,K. *et al.* The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* **277**, 333-338 (1997).
- Stagljar,I., Korostensky,C., Johnsson,N. & te Heesen S. A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5187-5192 (1998).

Symons, M. *et al.* Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* **84**, 723-734 (1996).

Tsien, R.Y. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509-544 (1998).

Urano, T., Emkey, R. & Feig, L.A. Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *EMBO J.* **15**, 810-816 (1996).

Van Aelst, L. Barr, M., Marcus, S. Polverino, A & Wigler, M. Complex formation between Ras and Raf and other protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 6213-6217 (1993).

Vetter, I.R. *et al.* Structural and biochemical analysis of Ras-effector signaling via RalGDS. *FEBS Lett.* **451**, 175-180 (1999).

Vidal, M. & Legrain, P. Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems. *Nucleic Acids Res.* **27**, 919-929 (1999).

Vidal, M., Brachmann, R.K., Fattaey, A., Harlow, E. & Boeke, J.D. Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 10315-10320 (1996).

Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M., & Cooper, J.A. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*, **74**, 205-214 (1993).

Welch, M.D. The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex. *Trends Cell Biol.* **9**, 423-427 (1999).

Wittinghofer, A. & Waldmann, H. Ras - A molecular switch involved in tumor formation. *Angew.* **39**, 4193-4214 (2000).

Wu,P. & Brand,L. Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal. Biochem.* **218**, 1-13 (1994).

Yang,M. Wu,Z. & Fields,S. Protein interactions analyzed with the yeast-two-hybrid system. *Nuc. Acid Res.* **23**, 1152-1156 (1995).

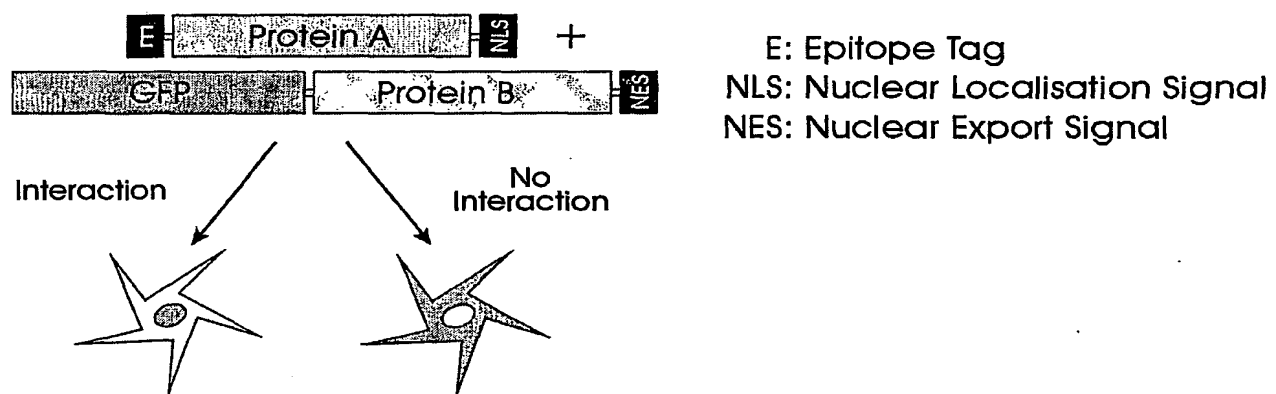
Zhang,M.J. & Dayton,A.I. Tolerance of diverse amino acid substitutions at conserved positions in the nuclear export signal (NES) of HIV-1 Rev. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 113-116 (1998).

Patentansprüche

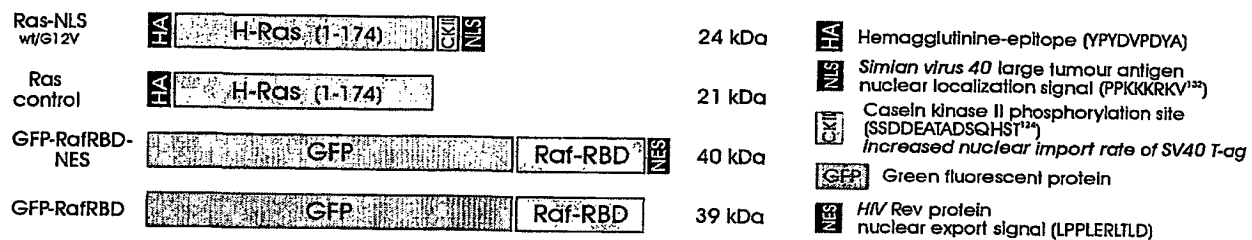
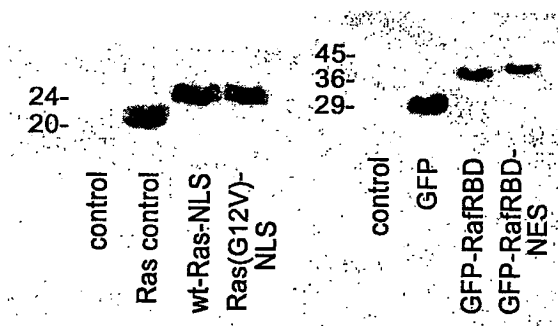
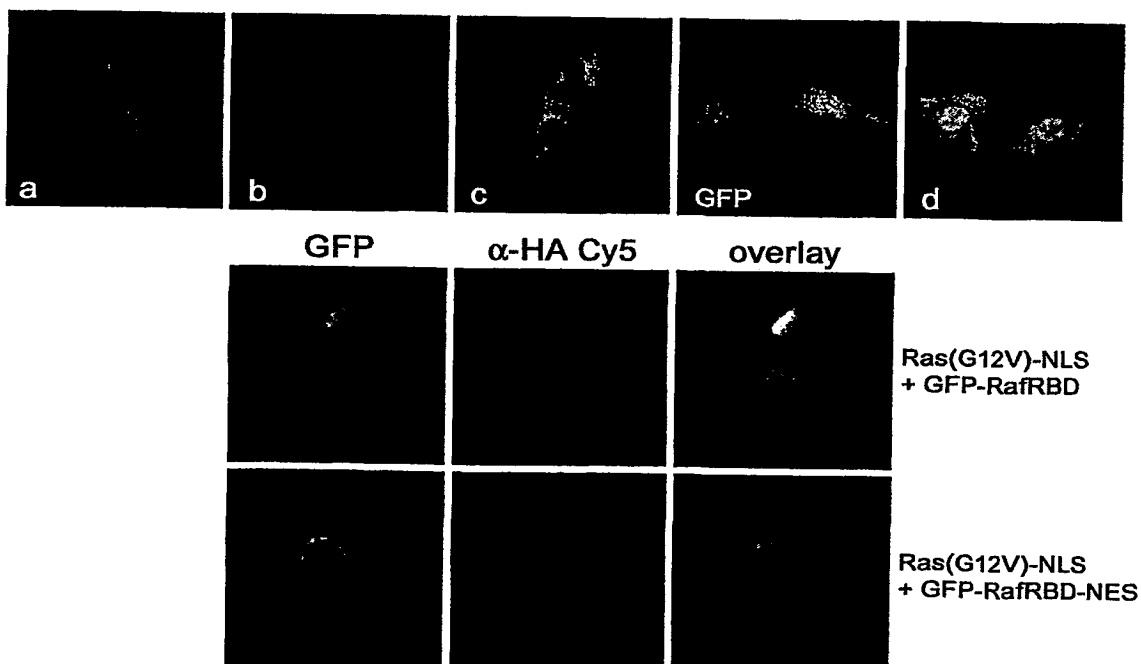
1. Verfahren zum Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen in Expressionssystemen wie Zellen, wobei ein Protein I mit einem Protein II interagiert, wobei ein Transfer des Protein I in ein Zellkompartiment erfolgt, in dem sowohl Protein I als auch Protein II natürlicherweise nicht vorkommen, und bei Nachweis von Protein II in dem Kompartiment, in das Protein I transferiert wurde, eine Wechselwirkung zwischen Protein I und Protein II festgestellt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Zellkompartiment Nukleus, Endoplasmatisches Reticulum, Nukleolus, Lysosomen, Golgi-Apparat, Dictyosomen, Mitochondrien, Chloroplasten, Peroxisomen, Vakuolen, Endosomen, ein periplasmatischer Raum oder eine Membran ist/sind.
3. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 2, wobei der Transfer des Protein I durch eine Signalsequenz, bevorzugt durch eine Kernlokalisationssequenz, erfolgt.
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Wechselwirkung durch spektroskopische Detektion, Fluoreszenzdetektion, Colorimetrie oder Radiometrie nachgewiesen wird.
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei Protein II ein Exportsignal, insbesondere ein Kernexportsignal, aufweist.
6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei Protein II ein Fusionsprotein mit einem fluoreszierenden Protein, bevorzugt GFP, ist.

7. Assay unter Verwendung des Verfahrens nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei Substanzen hinzugefügt werden, die möglicherweise mit der Protein-Protein Wechselwirkung interferieren.

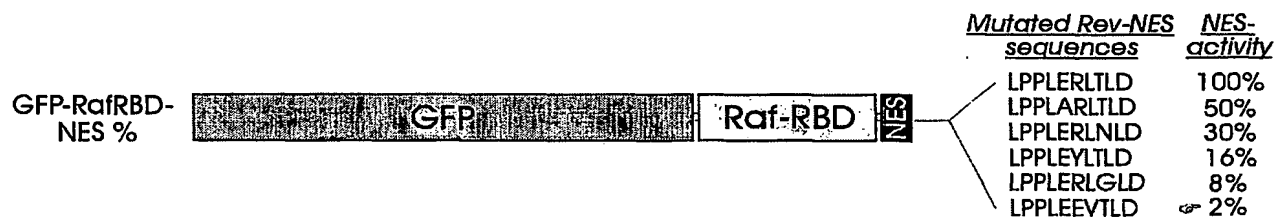
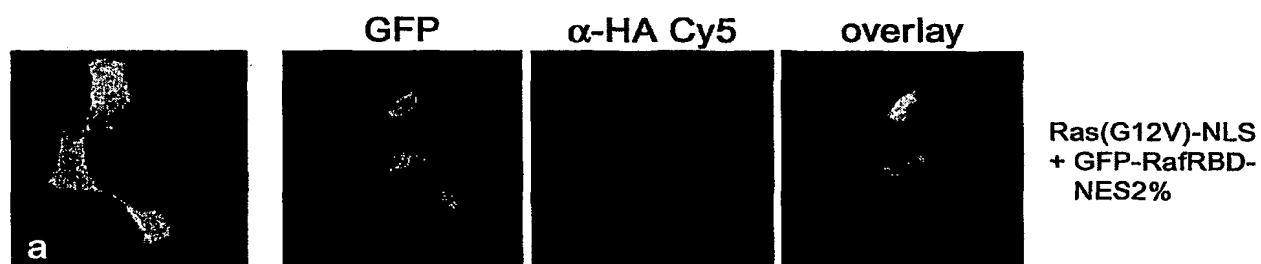
-1/7-

Fig. 1

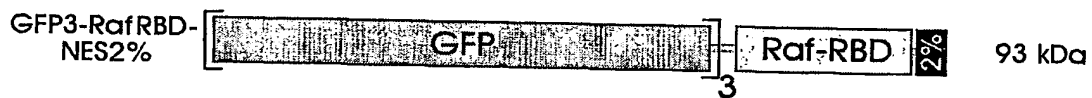
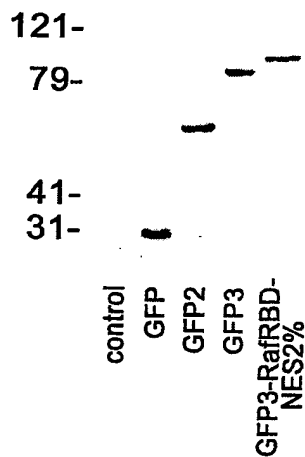
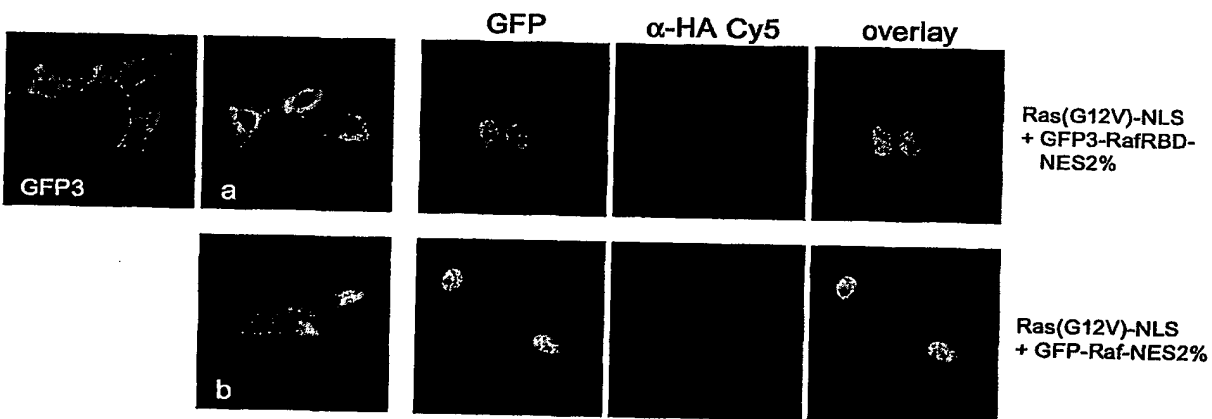
2/7-

Fig. 2**A****B****C**

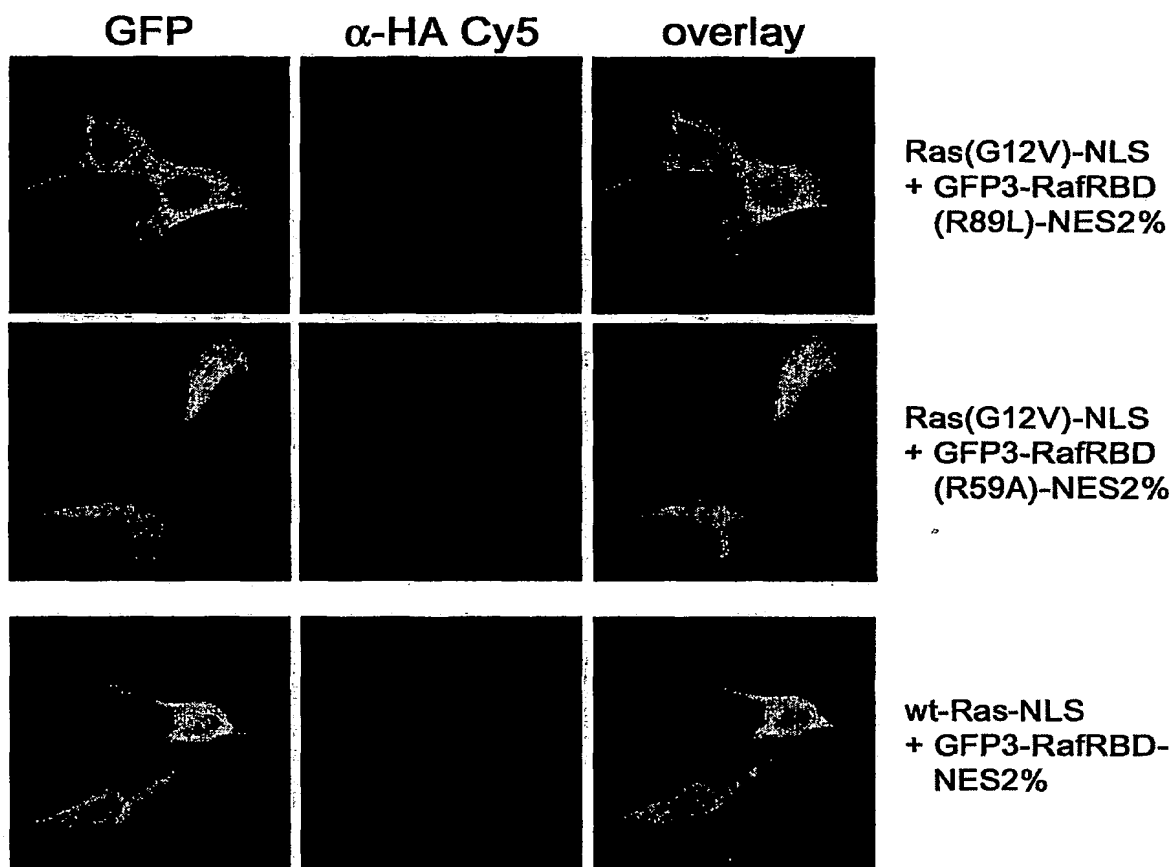
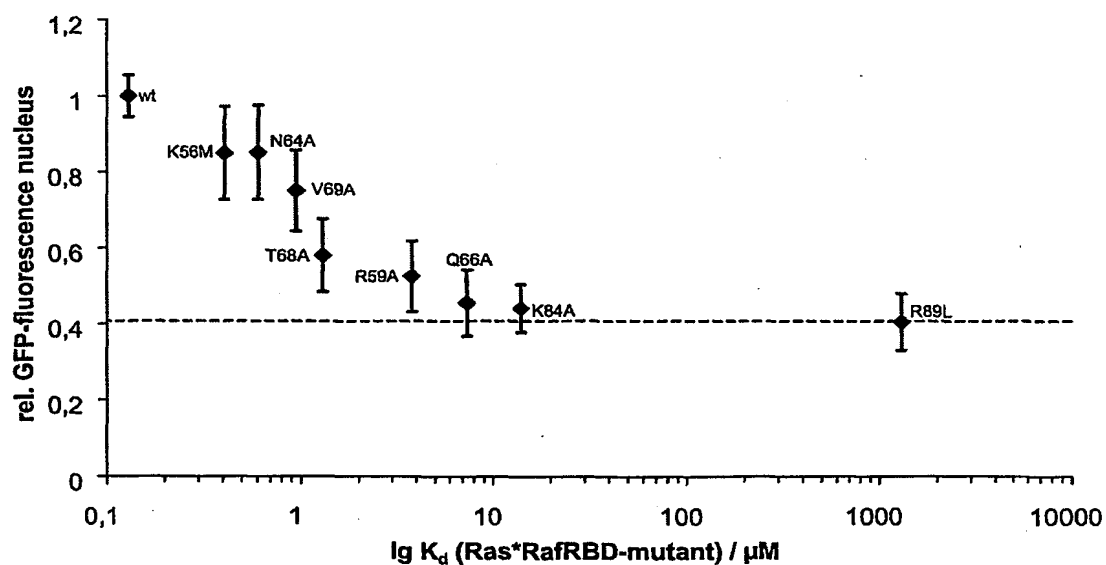
-3/7-

Fig. 3**A****B**

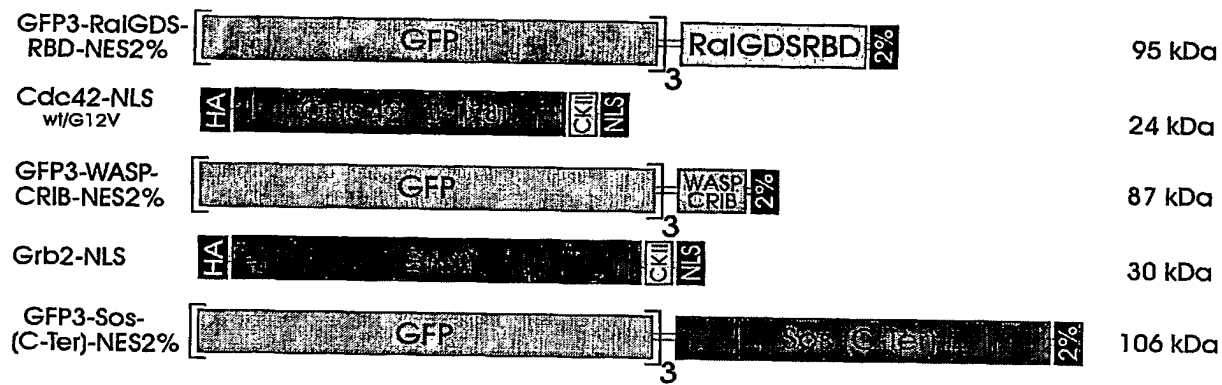
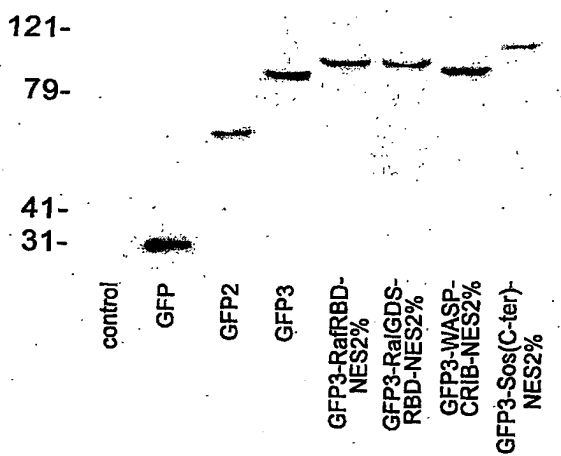
-4/7-

Fig. 4**A****B****C**

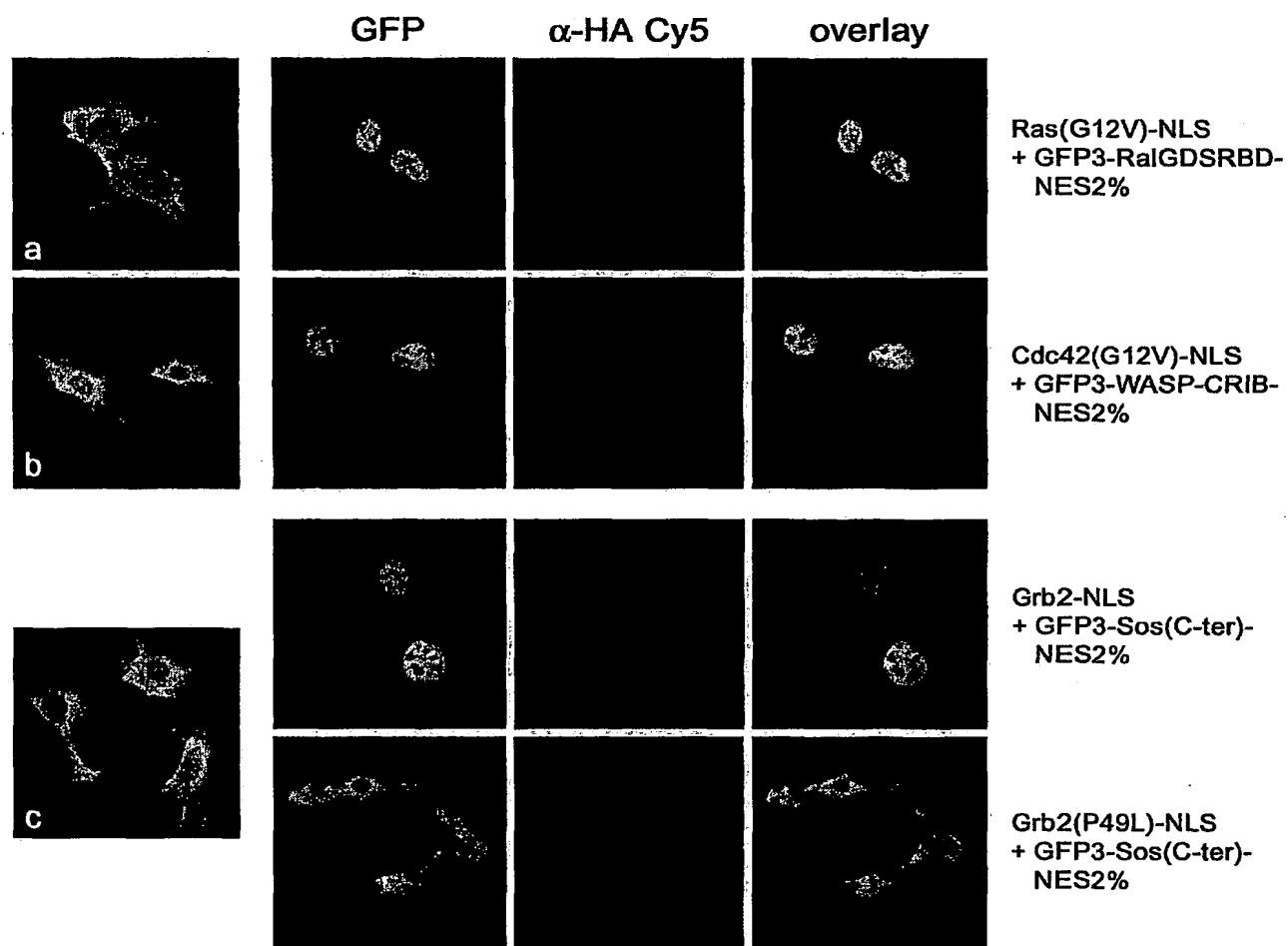
-5/7-

Fig. 5A**Fig. 5B**

-6/7-

Fig. 6A**Fig. 6B**

-7/7-

Fig. 6C

This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)